

平成 19年 2月

長谷川泰之 学位論文審査要旨

主 査 山 田 一 夫
副主査 大 坪 健 司
同 清 水 英 治

主論文

Dexamethasone inhibits phosphorylation of histone H3 at serine 10

(デキサメサゾンとはヒストンH3-セリン10のリン酸化を抑制する)

(著者：長谷川泰之、富田桂公、渡部仁成、山崎 章、佐野博幸、櫃田 豊、
清水英治)

平成17年11月 Biochemical Biophysical Research Communication 336巻
1049頁～1055頁

学 位 論 文 要 旨

Dexamethasone inhibits phosphorylation of histone H3 at serine 10

(デキサメサゾン[®]はヒストンH3-セリン10のリン酸化を抑制する)

真核生物の染色体DNAは、4種のコアヒストンからなる8量体に巻きつき、ヌクレオソームを形成する。さらに、その集合体であるクロマチンという複合体をつくり不必要な活性化を受けないよう保護されている。一部の遺伝子の転写反応を開始するためにはクロマチン構造の局所的な変化、いわゆるリモデリングが必要である。近年、その変化にヒストンのN末端、いわゆるヒストンテールの修飾（アセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化）が関与していることが明らかになってきた。ヒストンH3のリン酸化は、細胞周期におけるM期の染色体凝集に関与することは以前より知られているが、近年、アセチル化とともに細胞増殖因子による初期応答の遺伝子発現に関与していることが報告されている。本研究は、ステロイドホルモンの抗炎症作用メカニズムを明らかにする目的で、ヒストンH3リン酸化抑制作用について検討を行ったものである。

方 法

ヒト気道上皮細胞培養株であるA549細胞、BEAS-2B細胞を仔牛血清を含まないDMEM培地で72時間培養を行った。デキサメサゾン (10^{-9} M ~ 10^{-5} M) を添加1時間後、TNF- α (10 ng/ml) を15分~240分間添加刺激した。この前処置した各種細胞を細胞膜溶解剤で処理後、超音波破碎した。酸抽出法 (0.1 N HCl+0.1 N H₂SO₄) で処理し、ヒストンを抽出した。抽出したヒストンは、電気泳動 (SDS-PAGE) 後 Coomassie blue 染色を行い同定した。この電気泳動により分離されたヒストンのうちのリン酸化ヒストンH3のタンパク質量は、特異的抗ヒストンH3 (p-Ser10) 抗体を用いたWestern blot 法で解析した。前処置した各種細胞をアセトン・メタノールで固定後、特異的抗ヒストンH3 (p-Ser10) 抗体を用いて細胞レベルでのヒストンH3リン酸化をFlow cytometry法にて解析した。リン酸化ヒストンH3の細胞内局在分布は、前処置した各種細胞をホルマリン固定し、特異的抗ヒストンH3 (p-Ser10) 抗体、特異的抗リン酸化RNA polymerase II 抗体を用いた二重染色を行い、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡下で観察した。

結 果

Western blot法では、各前処理条件下においてヒストンH3タンパク質のリン酸化の程度には有意な差は認められなかった。そこで、さらに感度が良いとされている細胞レベルでの Flow cytometryによる解析を行った結果、TNF- α 刺激により誘導されるヒストンH3のリン酸化 (p-Ser10) は、TNF- α 刺激後15分をピークに促進する傾向がみられた。さらに、このリン酸化は、デキサメサゾン ($10^{-9}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$) の前処置で濃度依存性に有意に抑制された。共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の解析結果では、TNF- α 刺激により誘導されたヒストンH3のリン酸化 (p-Ser10) は、凝集したクロマチン周囲にスポットを形成し、デキサメサゾン処理により核内全体へ分散が観察された。また、リン酸化ヒストンH3は、リン酸化RNA polymerase IIの局在と一致していたが、デキサメサゾンの処理により、その局在は、RNA polymerase IIの辺縁に移動が認められた。

考 察

以上の結果より、ステロイドホルモンの抗炎症作用メカニズムの一つとして、ヒストンH3のリン酸化 (p-Ser10) を抑制し、また核内のリン酸化ヒストンの局在を変化させることでクロマチンのリモデリングを制御している可能性が示唆された。また、その作用はデキサメサゾン投与後1時間で生じており、細胞内ステロイドホルモン受容体と特異的プロモーター領域との結合を介さない、いわゆる“non-genomic effect”が主体であると推測された。今後の課題として、ヒストンH3のリン酸化と発現遺伝子の特異性、および核内の転写因子との関連について検討が必要と考える。

結 論

ステロイドホルモンの抗炎症作用の新たなメカニズムとして、ヒストンH3リン酸化の抑制が関わっている可能性が示唆された。